

パラフルオロフェニルアラニンがネギ属植物のカルスの増殖及び染色体数に及ぼす影響

田代 洋丞・宮崎 貞巳・金澤 幸三*

(蔬菜・花卉園芸学研究室)

昭和60年5月18日 受理

Effects of Para-fluorophenylalanine on the Growth and Chromosome Number of *Allium* Callus

Yousuke TASHIRO, Sadami MIYAZAKI, and Kōzō KANAZAWA

(Laboratory of Olericulture and Floriculture)

Received May 18, 1985

Summary

Effects of para-fluorophenylalanine (PFP) on the growth and chromosome number of callus were investigated in *Allium fistulosum* L. ($2n=16$, fFF), *A. ascalonicum* L. ($2n=16$, aAA), their diploid hybrids ($2n=16$, fAF, aAF), triploid hybrids ($2n=24$, fAFF, fAAF, aAFF, aAAF), and tetraploid hybrids ($2n=32$, fAAFF, aAAFF).

Calluses derived from the stem tips were cultured on MS medium supplemented with 0, 5, 10, 25, or 50 mg/l of PFP and 0.75 mg/l of 2,4-D for two months. The growth of calluses was gradually inhibited in all the material plants as the concentration of PFP rose. Cytoplasm and genome constitution of material plant appeared to be more important factors affecting the sensitivity of callus to PFP treatment than its ploidy level.

The calluses were subcultured three times on the medium supplemented with 0 or 5 mg/l of PFP and 0.75 mg/l of 2,4-D every two months. The cells with reduced chromosome number were successfully obtained by the PFP treatment only in the calluses derived from a triploid hybrid (aAAF) and tetraploid hybrids. In the PFP-treated calluses from tetraploid hybrids, triploid, hypo-, and hyper-triploid cells ($2n=21\sim27$) occurred frequently, while diploid cells ($2n=16$) very rarely. Normal karyotypes were scarcely found, and structural changes of chromosomes were often observed in both the non-PFP-treated and PFP-treated calluses from all the material plants.

From these results, it seems that PFP treatment of callus may not be a generally available method of haploidization in *Allium* plants.

緒 言

半数体は植物の育種に対して大きな利用価値を持っているので、薬培養法をはじめ多くの半数体作出法が開発されているが、いずれの植物にも有効な方法はまだ確立されていない。ところが、para-fluorophenylalanine (PFP) 処理が高等植物の半数体作出に有効であるという報告

*前佐賀大学教授

がなされ^{4, 9)}, 1例だけではあるが, 本方法によって野生稻 *Oryza punctata* subsp. *Schweinfurthiana* ($2n=48$) の半数体が作出されたことから⁷⁾, この方法に対して大きな期待が持たれている。また, PFP 処理によってイチゴ *Fragaria* × *ananassa* Duch. ($2n=56$) をはじめ多くの植物で染色体数が減少した個体あるいは細胞が得られたことから^{1, 6, 10, 12, 13)}, この方法は染色体数減少の有力な方法の一つとしても考えられるようになった。そこで, 本研究ではネギ属植物に対しても PFP 処理が半数化あるいは染色体数の減少に有効であるかを検討した。

材料及び方法

材料としてネギ *Allium fistulosum* L., シャロット *A. ascalonicum* L., 両者の2倍性雑種, 3倍性雑種及び4倍性雑種¹⁵⁾を供試した (Table 1)。

Table 1. Chromosome numbers, cytoplasms, and genome constitutions of material plants.

Material number	Material plant	Chromosome number ($2n$)	Cytoplasm and genome constitution ^{a)}
1	<i>Allium fistulosum</i>	16	fFF
2	<i>A. ascalonicum</i>	"	aAA
3	Diploid hybrid (<i>A. fistulosum</i> × <i>A. ascalonicum</i>)	"	fAF
4	"	"	aAF
5	Triploid hybrid (<i>A. fistulosum</i> × <i>A. ascalonicum</i>)	24	fAFF
6	"	"	fAAF
7	"	"	aAFF
8	"	"	aAAF
9	Tetraploid hybrid (<i>A. fistulosum</i> × <i>A. ascalonicum</i>)	32	fAAFF
10	"	"	aAAFF

a) f, F : Cytoplasm and genome of *A. fistulosum*.

a, A : " *A. ascalonicum*.

Table 2. Growth of calluses treated with different concentrations of PFP for 60 days.

Material number ^{a)}	Percentage of calluses that grew					Mean growth rate of callus (%)				
	Concentration of PFP (mg/l)					Concentration of PFP (mg/l)				
	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
1	96	60	57	11	0	183	80	67	12	0
2	64	27	9	0	0	127	55	9	0	0
3	100	100	88	44	0	333	230	219	89	0
4	100	100	86	55	19	322	223	186	77	24
5	100	100	100	50	0	350	279	210	70	0
6	100	88	92	14	0	267	125	115	14	0
7	100	86	55	14	0	267	100	55	19	0
8	100	27	35	18	0	211	36	39	19	0
9	100	100	100	70	9	325	240	257	110	10
10	94	40	32	10	5	200	45	32	10	15

a) See Table 1.

まず、これらの植物の茎頂を 2,4-D (0.75mg/ℓ) を加えた MS 寒天培地⁵⁾に植付け、60日間培養してカルスを形成させ、カルスのみをさらに同培地で60日間継代培養して増殖させた。次に、これらのカルスを分割して100mgのブロックとし、PFP (0, 5, 10, 25, 50mg/ℓ) 及び 2,4-D (0.75mg/ℓ) を加えた MS 寒天培地で60日間培養後、カルスの増殖個体率及び増殖率を調査した。また、カルスを PFP (0, 5 mg/ℓ) 及び 2,4-D (0.75mg/ℓ) を加えた MS 寒天培地で60日間ずつ3回継代培養することによって、PFP60日間処理区、120日間処理区及び180日間処理区をもうけ、カルス細胞の染色体調査を行った。なお、カルスの培養はすべて温度28°C、照度3,000ルクス、日長16時間の条件下で行った。また、染色体調査は、カルスを0.05%コルヒチン水溶液で3時間前処理後、酢酸・アルコール混合液(1:3)で固定し、ホイルゲン染色・おしつぶし法によって行った。

結 果

1. カルスの増殖

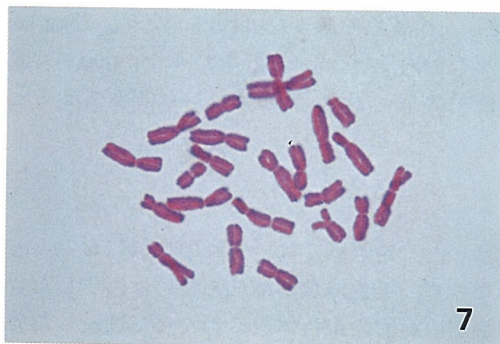
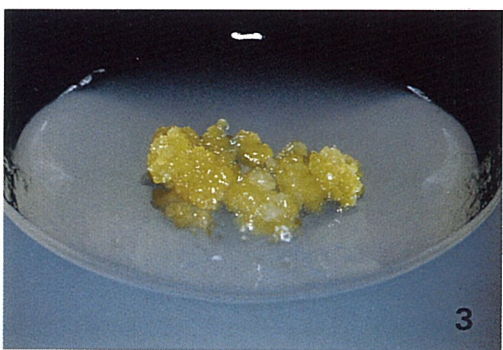
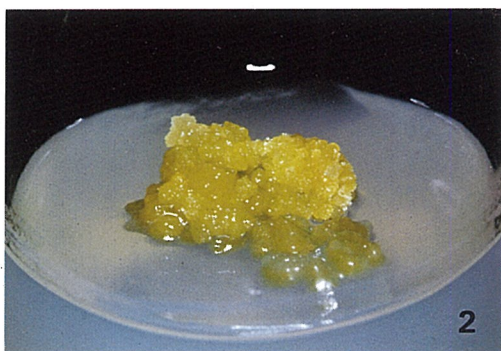
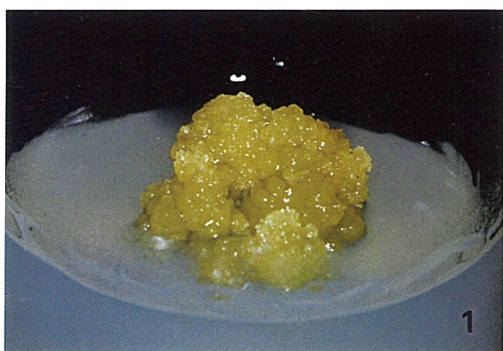
カルスの増殖個体率及び平均増殖率を Table 2 に示した。対照区 (PFP 0 mg/ℓ) ではすべての材料においてカルスの増殖個体率、平均増殖率が共に高く、雑種は両親よりカルスの増殖が良い傾向があった。また、2倍性雑種 (fAF, aAF) は共に増殖が良かったが、3倍性雑種 (fAFF, fAAF, aAFF, aAAF) 及び4倍性雑種 (fAAFF, aAAFF) では細胞質及びゲノム構成により差異が見られた。すなわち、ゲノム構成が同じ材料間ではネギの細胞質 (f) を持つ材料がシャロットの細胞質 (a) を持つ材料より増殖が良く、細胞質及び倍数性が同じ材料間ではネギのゲノム (F) を多く持つ材料がシャロットのゲノム (A) を多く持つ材料より増殖が良かった。

PFP 処理区と対照区を比較すると、PFP 処理区ではすべての材料においてカルスの増殖が抑制された。PFP 処理によるカルスの増殖抑制の程度には材料間差があり、増殖個体率が対照区の50%以下に抑制された PFP の濃度は、シャロット、3倍性雑種 (aAAF) 及び4倍性雑種 (aAAFF) では5mg/ℓ、ネギ、2倍性雑種 (fAF) 及び3倍性雑種 (fAFF, fAAF, aAFF) では25mg/ℓ、2倍性雑種 (aAF) 及び4倍性雑種 (fAAFF) では50mg/ℓであった。また、平均増殖率が対照区の50%以下に抑制された PFP の濃度は、ネギ、シャロット、3倍性雑種 (fAAF, aAFF, aAAF) 及び4倍性雑種 (aAAFF) では5mg/ℓ、その他の材料では25mg/ℓであった。したがって、対照区のカルス増殖が比較的に悪かった材料は低濃度の PFP によってカルスの増殖が抑制される傾向にあった。なお、50mg/ℓ 区ではほとんどの材料においてカルスの増殖が見られなかった。

0, 5 及び10mg/ℓ 区のカルスはほぼ均一に増殖し、淡黄色であった (Figs. 1, 2)。25mg/ℓ 区のカルスは部分的に増殖し、淡黄色と白色のモザイク状であった (Fig. 3)。また、50mg/ℓ 区のカルスはほとんどの部分が枯死し、灰白色で半透明になったが、褐変あるいは黒変することはなかった (Fig. 4)。

2. カルス細胞の染色体数

カルス細胞の染色体数別頻度分布を Table 3 に示した。対照区ではいずれの材料においてもカルスの親植物と同じ染色体数のカルス細胞のみならず、染色体数が増加あるいは減少したカルス細胞が高頻度で観察された。また、カルス細胞が広範囲の染色体数にわたって連続した分布を示した場合が少なかった。対照区のカルス細胞の染色体数別頻度分布には材料間で相違



Figs. 1—8.

が見られたが、染色体数の増減と材料の倍数性、細胞質及びゲノム構成との関連は明確でなかった。

PFP180日間処理区のネギ、シャロット及び3倍性雑種 (fAFF, aAFF) のカルス細胞の染色体数別頻度分布には対照区と比較して顕著な相違は見られなかったが、他の材料では顕著な相違が見られた。すなわち、2倍性雑種 (fAF) 及び3倍性雑種 (fAAF) のカルスでは高次の倍数性細胞の頻度が対照区より高く、2倍性雑種 (aAF) 及び3倍性雑種 (aAAF) のカルスでは低かった。また、3倍性雑種 (aAAF) 及び4倍性雑種 (fAAFF, aAAFF) のカルスでは染色体数の減少がみられた細胞が対照区より高い頻度で出現し、染色体数減少の程度も大きかった。PFP180日間処理による染色体数の減少が特に顕著であった4倍性雑種 (fAAFF, aAAFF) についてはPFP60日間処理区及び120日間処理区のカルの染色体調査も行った結果、両者共にカルス細胞の頻度分布はPFP処理期間が長いほど染色体数減少の方に偏っていた。4倍性雑種 (fAAFF, aAAFF) の180日間処理区では3倍性細胞 (低3倍体, 正3倍体, 高3倍体) が高い頻度で観察された。しかし、親植物の半分の染色体数 ($2n=16$) のカルス細胞は4倍性雑種 (fAAFF) のPFP120日間処理区及び4倍性雑種 (aAAFF) のPFP180日間処理区で1個ずつ観察されたのみであった。

対照区、PFP処理区共にいずれの材料においてもカルス細胞の多くは、染色体数の増減のみならず、欠失、転座、融合などの染色体突然変異が単独あるいは組合わさった複雑な核型上の変異を生じていた (Figs. 5—8)。特に、ネギ及びシャロットのゲノム (F, A) のいずれでも観察されないアクロセントリック染色体や2動原体的染色体などの新しいタイプの染色体を有する細胞がしばしば観察された (Figs. 7, 8)。また、休止期にあるカルス細胞の核の大きさ、仁の大きさ及び数にも著しい変異が見られ、大小の小核を持つ細胞も観察された。

カルの増殖とカルス細胞の染色体数別頻度分布との間に明確な相関は見られなかった (Table 2, 3)。

Explanation of figures

Figs. 1—4 External appearances of calluses derived from the tetraploid hybrid (fAAFF) and treated with different concentrations of PFP for 60 days.

1. PFP 0 mg/l.
2. " 5 " .
3. " 25 " .
4. " 50 " .

Fig. 5 Mitotic metaphase chromosomes of a root tip cell of the tetraploid hybrid (fAAFF).

$$K_{(2n)} = 32 = 28V + 2J_1 + 2J_2.$$

Figs. 6—8 Mitotic metaphase chromosomes of callus cells derived from the tetraploid hybrid (fAAFF) and treated with 0 or 5 mg/l of PFP for 180 days.

6. PFP 0 mg/l.
 $K_{(2n)} = 35 = 32V + J_1 + J_2 + J_2.$
7. PFP 5 mg/l.
 $K_{(2n)} = 23 = 18V + \text{D.C.} V + 3J_1 + J_2.$
8. PFP 5 mg/l.
 $K_{(2n)} = 21 = 15V + \text{D.C.} V_1 + \text{D.C.} V_2 + 2J_2 + J_3 + i.$

Table 3. Chromosome numbers of callus cells treated

Material number ^{a)}	Conc. of PFP (mg/l)	Period of treatment	Number of cells observed														Frequency		
				12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23				
1	0	180	300		1	4	49	95	30	8	6	10	14	20	24				
	5	"	299	1	8	28	43	31	21	9	12	4	2	3	3				
2	0	"	250	4	1	9	23	162	3										
	5	"	261			2	26	202	19	5									
3	0	"	300			5	78	123	54	24	4	3	2						
	5	"	300		3	1	14	46	27	9	8	2	4	9	11				
4	0	"	250				20	48	4		1								
	5	"	300		3	7	61	206	9	2		1		1					
5	0	"	300								1	1	3	30	34				
	5	"	300								6	10	23	48	40				
6	0	"	300									2	13	35	57				
	5	"	300							1		3	2	3	2				
7	0	"	268								3	21	50	71	31				
	5	"	270								1	9	16	32	34				
8	0	"	250					1		1		4	10	37	53				
	5	"	204					2	13	38	38	23	39	16	3				
9	0	60	229																
		120	231												1				
		180	239																
	5	60	300										3	4					
		120	300				1	1							3				
		180	111										2	6	11				
10	0	60	226																
		120	84																
		180	154																
	5	60	213									2							
		120	233								1		3	27	56				
		180	300					1			1	10	26	44	61				

a) See Table 1.

with 0 or 5 mg/l of PFP for different days.

distribution of cells showing different chromosome numbers

24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41-48	49-64	65-191
16	6	6	4		2	3			1					1					
10	12	31	25	18	19	9	4	2									1	3	
	4	8	18	10	2	2		2										2	
					1		1	4	1										
1				2			3	1											
25	20	21	15	9	16	14	9	16	6	1	3		3	1			6	1	
4	1		6	7	19	16	22	16		1		1	1				8	75	
			3	4	2	1													
82	32	27	14	5	1	1				3	1		5	4	4	10	41	1	
32	15	10	7	4	5		1	6	5	8	9	5	10	15	5	14	22		
107	47	19	12	6	2														
10	4	3	3	8	8	6	11	16	12	12	17	29	22	31	19	26	48	4	
30	3	2	1	1							1	1	4		6	2	22	17	2
91	47	20	3		1			1								1	9	4	1
62	3	5	3					2	1			1	2	5	8		50	2	
1										3	5	9		3		1	6	1	3
		6	8	12	27	51	48	59	11	2		1					1	3	
	1	1	1	1	5	17	23	45	40	33	36	5		1	1			20	
		3	6	4	28	33	49	59	22	10	8	9	4	1		2	1		
1	13	23	37	62	48	42	32	24	3	1		1			1		1	4	
11	20	41	38	40	55	30	17	19	10	3	7	1	2		1				
25	24	23	9	6		1	2	1									1		
	4	5	13	9	28	45	65	48	2	1								6	
			1	4	17	28	13	11	1									8	1
					7	11	9	50	15	14	18	6	8	3		3	2	8	
2	5	12	27	34	31	30	14	11								1	27	8	9
32	4	2	18	49	11	7	5	1									1	15	1
44	43	36	12	11	7	2					1						1		

考 察

本研究ではネギ、シャロット、両者の2倍性雑種、3倍性雑種及び4倍性雑種を供試してカルスのPFP処理を行った結果、PFPの影響によってカルス細胞の染色体数が減少したのは3倍性雑種の一部と4倍性雑種のみであり、染色体数が半分に減少したカルス細胞は非常にまれにしか出現しなかった。したがって、カルスのPFP処理によってネギ属植物一般の半数体を作出するのは困難であると考えられる。しかし、PFPが種々の倍数性カルスの増殖及び染色体数に及ぼす影響について2、3の知見が得られたので、以下に考察を加える。

Guptaら³⁾はタバコ *Nicotiana tabacum* の2倍体及び半数体から得たカルスをPFP (1~15 mg/ℓ)を加えた培地で6週間培養した結果、2倍体のカルスはPFP濃度が高いほど増殖が抑制され、9 mg/ℓ以上ではほとんど増殖しなかったが、半数体のカルスの増殖はいずれのPFP濃度でも抑制されなかったことを報告している。また、Niizeki⁸⁾はGuptaらと同じ材料をPFP (50~200 mg/ℓ)を加えた培地で1ヵ月間培養し、2倍体及び半数体のカルスは共にPFP濃度が高いほど増殖が抑制されたが、低濃度での抑制は半数体のカルスの方が軽かったことを報告している。これらの結果から、彼らはPFPが倍数性細胞の増殖を選択的に抑制し、半数性カルスを維持する効果を持つと考えた。タバコは複2倍体であるので²⁾、彼らが用いた2倍体 ($2n=48$, SSTT) と半数体 ($2n=24$, ST) の関係は本研究で用いた材料の中の4倍性雑種 (fAAFF, aAAFF) と2倍性雑種 (fAF, aAF) の関係に相当すると考えることができる。ところが、本研究の結果では、PFP処理した4倍性雑種 (aAAFF) のカルスは2倍性雑種 (aAF) のカルスより増殖が強く抑制されたが、4倍性雑種 (fAAFF) と2倍性雑種 (fAF) のカルスの増殖には差がなかった。したがって、前述のタバコにおいて観察された半数性細胞の増殖に対するPFPの選択的効果は必ずしもすべての植物に有効ではないと考えられる。さらに、本研究の結果では同じ倍数性の材料間でも細胞質及びゲノム構成によってカルスの増殖に対するPFPの影響は異なる場合が多かった。したがって、PFPの効果は材料の倍数性のみによって決定されるような単純なものではないと考えられる。なお、PFPがカルスの増殖に及ぼす影響を材料の細胞質及びゲノム構成と関連させて検討した研究は本研究に限られるので、今後他の植物についても検討する必要がある。

PFPがカルス細胞の染色体数に及ぼす影響には供試した材料間で大きな相違が見られた。このような相違は材料の倍数性、細胞質及びゲノム構成と関係があるとともに、PFPの作用機作及びカルス細胞集団の淘汰の様式と関係があると考えられる。Noda¹¹⁾はライコムギ *Triticosecale* Wittmack の種子根をPFP処理して根端細胞の分裂異常を調査し、C-metaphaseと遅滞染色体を持つ後期細胞が高い頻度で出現したことから、PFPは紡錘体の形成あるいはその機能に影響を与えると考えた。さらに、彼はPFP処理による染色体減少の主な原因は後期細胞で見られる遅滞染色体にあると推測した。PFPはライコムギ以外の植物の細胞に対しても同様な作用を持ち、ネギ属植物も例外ではないと考えられるが、カルス細胞集団の中での染色体数が減少した細胞の出現頻度にはさらに多くの要因が関係していると考えられる。培養中の細胞間の競争が特に激しいとは考えられないが、変異を生じた染色体の種類、本数あるいは組合せによってカルス細胞の生存力あるいは増殖力が異なり、これらの細胞が淘汰を受ける様相は異なるであろう。また、植物の種類、倍数性、細胞質及びゲノム構成などは変異細胞の生存あるいは増殖に大きな制約を加えると考えられるので、変異細胞の消長はさらに微妙なものになると考えられる。また、本研究ではすべての材料について染色体調査用のカルスを確保するためにPFP処理を5 mg/ℓの濃度で行ったが、材料のPFP濃度に対する感受性は異なる可

能性がある。本研究で観察された PFP 処理に対する材料間差は以上のような種々の要因が総合的に働いた結果表われたものと考えられる。なお、PFP がカルスの増殖に及ぼす影響とカルス細胞の染色体数に及ぼす影響の間には相関が見られなかったもので、これらに関する PFP の二つの作用は互に独立していると考えられる。

ネギとシャロットの 4 倍性雑種のカルスでは PFP 処理によって染色体数が経時的に減少し、180日間処理の結果ではほとんどの細胞が 3 倍性であった。これらの 3 倍性細胞の中の染色体数が 24 の細胞について核型を詳細に分析した結果、これらは様々な核型の細胞の集団であることが判明した。したがって、これらの材料については PFP 処理をさらに連続して行うことによって、染色体数がさらに減少したカルスを得ることも可能であろう。このようにして染色体数が半分に減少した細胞を多数得ることができるとしても、これらは染色体変異を種々に生じている可能性が非常に大きい。したがって、これらの材料についてもカルスの PFP 処理は正半数体作出の方法としては期待が持てないが、非常に変異に富む異数体群の作出方法としては有効であろう。なお、細胞質及びゲノム構成が 4 倍性雑種 (fA AFF) と同じである 4 倍性ワケギ ($2n=32$, fA AFF¹³⁾) のカルスからの植物体再分化は比較的容易であり、異数体あるいは染色体突然変異体が多数得られているので¹⁴⁾、PFP 処理した 4 倍性雑種のカルスからの植物体再分化も困難ではないと考えられる。

摘 要

PFP 処理がネギ属植物の半数化あるいは染色体数の減少に有効であるかを検討するために、ネギ、シャロット、両者の 2 倍性雑種、3 倍性雑種及び 4 倍性雑種のカルスの PFP 処理を行い、カルスの増殖及び染色体数を調査した。

PFP 処理によりすべての材料のカルスの増殖が抑制された。抑制の程度は材料の倍数性よりも細胞質及びゲノム構成によって異なる傾向があった。PFP 5 mg/l で 180 日間処理した結果、染色体数が減少したのは 3 倍性雑種の一部と 4 倍性雑種のカルスのみであった。4 倍性雑種のカルスではほとんどの細胞の染色体数が減少していたが、これらの細胞の大部分は 3 倍性、低 3 倍性あるいは高 3 倍性であり、2 倍性細胞はごくまれにしか観察されなかった。また、いずれの材料の対照区及び PFP 処理区においてもカルス細胞の多くは染色体数の増減のみならず、複雑な染色体変異を生じていた。

以上の結果から、カルスの PFP 処理によってネギ属植物一般の正半数体を作成するのは困難であると考えられる。

謝 辞

当研究室専攻生の上土井浩治君並びに田中良弘君の熱心な協力によって本研究を遂行することができた。ここに記して両君への感謝の意を表す。なお、本研究は昭和 56, 57, 58 年度文部省科学研究費補助金 (一般研究 B 56480035 組織培養・化学物質法による栄養繁殖性蔬菜・花卉の育種方法に関する研究) を受けて行った研究の一部である。

引 用 文 献

- 1) 福井希一・新関宏夫 (1983). 植物体細胞における染色体操作法, 特に PFP 処理による染色体減数法に

- ついて. 農技研報 D 34 : 113—185.
- 2) Gerstel, D.U. (1963). Evolutionary problems in some polyploid crop plants. *Hereditas*, suppl. 2 : 481—504.
 - 3) Gupta, N. and P.S. Carlson (1972). Preferential growth of haploid plant cells *in vitro*. *Nature new biology* 239 : 86.
 - 4) Knight, R.L., A.P. Hamilton and E. Keep (1963). Somatic reduction of chromosome number in a *Ribes* hybrid following treatment with para-fluorophenylalanine. *Nature* 200 : 1341—1342.
 - 5) Murashige, T. and F.A. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473—497.
 - 6) 村田達郎・新関宏夫・宮司佑三・工藤政明 (1984). かんしょ塊根由来の培養組織における PFP 処理の影響. 育種 34 (別冊 2) : 308—309.
 - 7) 新関宏夫 (1977). パラフルオロフェニルアラニン処理により作出された *Oryza punctata* subsp. *Schweinfurthiana* の半数体. 育種 27 (別冊) : 124—125.
 - 8) Niizeki, M. (1974). Studies on plant cell and tissue culture IV. Effect of para-fluorophenylalanine on haploid and diploid cells of tobacco plant *in vitro*. *J. Fac. Agri., Hokkaido Univ.* 57 : 350—356.
 - 9) Nitzsche, W. (1973). Mitotische Chromosomenreduktion in höheren Pflanzen durch 3-Fluor-phenylalanin. *Naturwissenschaft.* 60 : 390.
 - 10) Nitzsche, W. (1980). Chromosome reduction by halogenized amino acids in *Festuca-Lolium* hybrids. *Z. Pflanzenzüchtg.* 84 : 78—81.
 - 11) Noda, K. (1982). Chromosome reduction in root meristems of triticale “Carman” by para-fluorophenylalanine. *Seiken Ziho* 30 : 9—15.
 - 12) Omura, M. and T. Akihama (1981). Induced somatic reduction of chromosome number in a tetraploid grape shoot after *p*-fluorophenylalanine treatment. *HortScience* 16 : 653—654.
 - 13) 助清泰教・國分禎二・佐藤宗治・陸漱韻 (1984). 授粉花の PFP 処理によるサツマイモ染色体の減数. 育種 34 (別冊 2) : 312—313.
 - 14) 田代洋丞・諸岡美郷・宮崎貞巳 (1977). 組織培養による倍数性育種に関する基礎的研究 (第 8 報) 培養生 4 倍体ワケギの再培養生株の染色体調査. 園学要旨 昭52秋 : 188—189.
 - 15) 田代洋丞 (1984). ワケギの起源に関する細胞遺伝学的研究. 佐賀大農彙 56 : 1—63.